

菜青虫感染蜡蚧轮枝菌后的组织病理变化

张仙红, 李文英, 贺运春, 王建明, 郝 赤

(山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要: 对感病菜青虫 *Pieris rapae* 组织切片的观察研究表明, 蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* 主要通过昆虫的体壁侵染虫体。菜青虫各龄幼虫在体壁接菌 12 h 后, 附着在虫体表面的孢子即可萌发。2~3 龄幼虫, 蜡蚧轮枝菌菌丝 24 h 就可穿透体壁进入血腔, 48 h 可见脂肪体等器官发生病变; 4~5 龄幼虫, 36 h 菌丝才可穿透体壁, 48 h 可见虫体内有部分菌丝体。侵入虫体内的菌丝对寄生组织没有选择性。菌丝首先在入侵的血腔中生长, 然后侵入脂肪体和肌肉, 随菌丝在虫体内的增殖, 中肠、马氏管、丝腺等相继被侵染。受侵的组织器官均发生明显的病变, 如体壁分离, 脂肪体变形、溶解, 肌纤维排列松散, 中肠上皮细胞脱落并出现许多空泡等。

关键词: 菜青虫; 蜡蚧轮枝菌; 组织病变

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2003) 05-0655-05

Histopathological changes of *Pieris rapae* (L.) larvae infected by *Verticillium lecanii* (Zimm.) viega

ZHANG Xian-Hong, LI Wen-Ying, HE Yun-Chun, WANG Jian-Ming, HAO Chi (Agricultural College, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: A histopathological study on *Pieris rapae* (L.) larvae infected by *Verticillium lecanii* (Zimm.) viegas showed that the fungi infected the insect body mainly by penetrating the cuticle. The conidia on the cuticle of *P. rapae* larvae germinated in 12 h after inoculation. The hyphae penetrated the cuticle of the 2nd and 3rd instar larvae in 24 h and pathogenesis started on their fat body in 48 h. The hyphae penetrated the cuticle of 4th and 5th instar larvae in 36 h. Some hyphae were observed inside the body in 48 h. Invasion of the hyphae upon the host tissues showed no significant selection. They grew in hemolymphs firstly and then entered the fat body and the muscle. As the hyphae grew, the mid gut and the malpighian tube and the silk gland were infected successively. Pathological changes occurred on all infected tissues and organs, including cuticle disintegration, malformation and dissolution of the fat body, loose muscle fibre layout, disappearance of cells of the midgut epithelium and vacuolization.

Key words: *Pieris rapae*; *Verticillium lecanii*; histopathologic changes

蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* (Zimm.) 是一类重要的昆虫病原真菌。自 20 世纪 70 年代以来, 蜡蚧轮枝菌的研究引起了国内外的广泛关注。关于该菌的分类、形态特征、生物学特性、培养技术 (罗小刚, 1988; 李国霞等, 1991, 1996; Feng *et al.*, 2000) 以及对害虫的防治效果 (Hall, 1981, 1982; 李国霞等, 1992, 1995), 国内外学者已进行了许多研究。但有关该菌的致病机理目前仅 Askary 等 (1998) 对蚜虫进行了研究, 为了解蜡蚧轮枝菌对其它昆虫的致病性, 作者于 1997~1999 年进行了该菌对菜青虫 *Pieris rapae* (L.) 的侵入方式及感病

虫体的组织病理变化研究, 为进一步揭示该菌的致病机理和利用该菌防治害虫提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蜡蚧轮枝菌菌株从自然感病的星天牛成虫体上分离纯化获得, 供试菜青虫为田间采集的卵粒于室内孵化后备用。

1.2 方法

接菌方法分体表喷雾和饲喂两种处理, 每处理

基金项目: 山西省青年基金项目 (20001039)

作者简介: 张仙红, 女, 1966 年 3 月生, 山西平遥人, 在读博士, 副教授, 从事昆虫病理学方面的研究, E-mail: zxh6288@sina.com

收稿日期 Received: 2002-11-05; 接受日期 Accepted: 2003-05-19

供试幼虫分 2~3 龄和 4~5 龄两组。

1.2.1 体表喷雾接菌法：取培养 10 天的蜡蚧轮枝菌分生孢子，配制成 4×10^8 /mL 的孢子悬浮液，并加 0.1% 的 Tween-80，用喉头喷雾器将制好的孢子悬浮液喷于供试幼虫体表，至虫体表面湿润为止，移入培养皿，并加入新鲜甘蓝叶片。试验在 25℃，硫酸铵饱和溶液控制相对湿度在 81%（方中达，1998）的条件下进行。每隔 12 h 挑选明显感病或死亡的虫体，用 Bouin 氏固定液固定 2 天（武觀文等，1980），保存于 70% 的酒精中。每处理 20 头幼虫，用清水处理的幼虫作为对照。

1.2.2 饲喂接菌法：将新鲜的甘蓝叶片在 4×10^8 /mL 的孢子悬浮液中浸 1 min，晾干后饲喂菜青虫。取食 48 h、饥饿 48 h 后进行固定。

1.2.3 组织切片法：将保存的虫体取其 2~3 腹节，用常规石蜡切片法进行组织切片。切片厚度 8 μ m，用番红-固绿对染法染色。显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 感病虫体症状

菜青虫体壁接菌后，2~3 龄幼虫 48 h、4~5 龄幼虫 72 h 开始表现出感病症状，即腹部出现一些小的黑色斑点，虫体活动减弱，有些还不停地抽搐、翻滚，头部仰起不停地左右晃动，体色逐渐由绿色变为灰色，腹足变黑，体表出现近圆形的黑色凹陷斑或某一腹节变黑（图版 I：1）。2~3 龄幼虫 72 h、4~5 龄幼虫 120 h 感病虫体开始出现死亡。虫体死后 48 h 从口腔、肛门等处先长出菌丝，然后从节间膜、腹足等处也长出菌丝。但有部分感病菜青虫蜕皮后又可恢复正常。

2.2 病菌侵入方式

组织切片观察表明，采用饲喂接菌法处理的各龄菜青虫，在取食带菌的甘蓝叶片后，食入消化道的孢子 96 h 仍未萌发（图版 I：2）。而采用体表喷雾接菌法处理的菜青虫，接菌后 12 h 即可见虫体表面有萌发的孢子（图版 I：3），2~3 龄幼虫 24 h 可见菌丝穿透体壁。由此可见该菌主要是通过体壁侵染虫体。

2.3 病菌的侵染过程

组织切片观察表明，各龄幼虫在体壁接菌 12 h 即可见虫体表面有萌发的孢子（图版 I：3）。2~3 龄幼虫，接菌 24 h 芽管即可穿透体壁进入血腔，48 h 体壁、脂肪体均发生病变。4~5 龄幼虫，接

菌 36 h 芽管才穿透体壁（图版 I：4），48 h 可见虫体内有部分菌丝体（图版 I：5）。

接菌不同时间虫体组织切片观察表明，幼虫体表附着的孢子萌发后产生芽管，芽管向表皮内部生长，穿透表皮后逐步形成菌丝，纵向穿过表皮细胞进入血腔中，在此菌丝大量增殖。少数菌丝穿透表皮后横向沿表皮层和皮细胞层增殖。进入体腔内的菌丝体，对寄主组织没有选择性。通常菌丝最初在侵入部位的血腔中生长，然后侵入邻近的脂肪体、肌肉，随菌丝在虫体内扩展，消化道和丝腺等相继被侵染，最后受侵染的各组织器官均发生明显的病理变化，感病昆虫不久即死亡。

2.4 感病虫体组织病变

从组织切片上可以看出，正常菜青虫体壁是由表皮层、皮细胞层和基底膜组成（图版 I：6），感病后，表皮层与皮细胞层发生分离，整个体壁分层不明显；染菌前的脂肪体为不规则形，可见明显的边缘且光滑整齐（图版 I：6），染菌后脂肪体明显变形、且被溶解，成为脂肪体细胞混合的碎片网（图版 II：7）；正常的消化道是一层柱状的大型肠壁细胞包围着围食膜（图版 II：8），染菌后，中肠上皮细胞排列松弛、脱落，部分形成空泡（图版 II：9）；正常的肌纤维排列紧密（图版 I：6），染菌后肌纤维呈疏松状，内部可见有菌丝体存在（图版 II：10）；正常的丝腺外层细胞排列紧密，中间空腔有许多分泌物（图版 II：8），染菌后丝腺外层的细胞脱落解体（图版 II：11）；最后整个虫体组织解体，各组织变得模糊不清（图版 II：12）。

3 讨论

试验表明：菜青虫低龄幼虫抵御蜡蚧轮枝菌侵入的能力较差，这可能是由于低龄幼虫体壁的角质层不够坚硬，有利于芽管侵入，因此防治菜青虫应抓住低龄幼虫期。

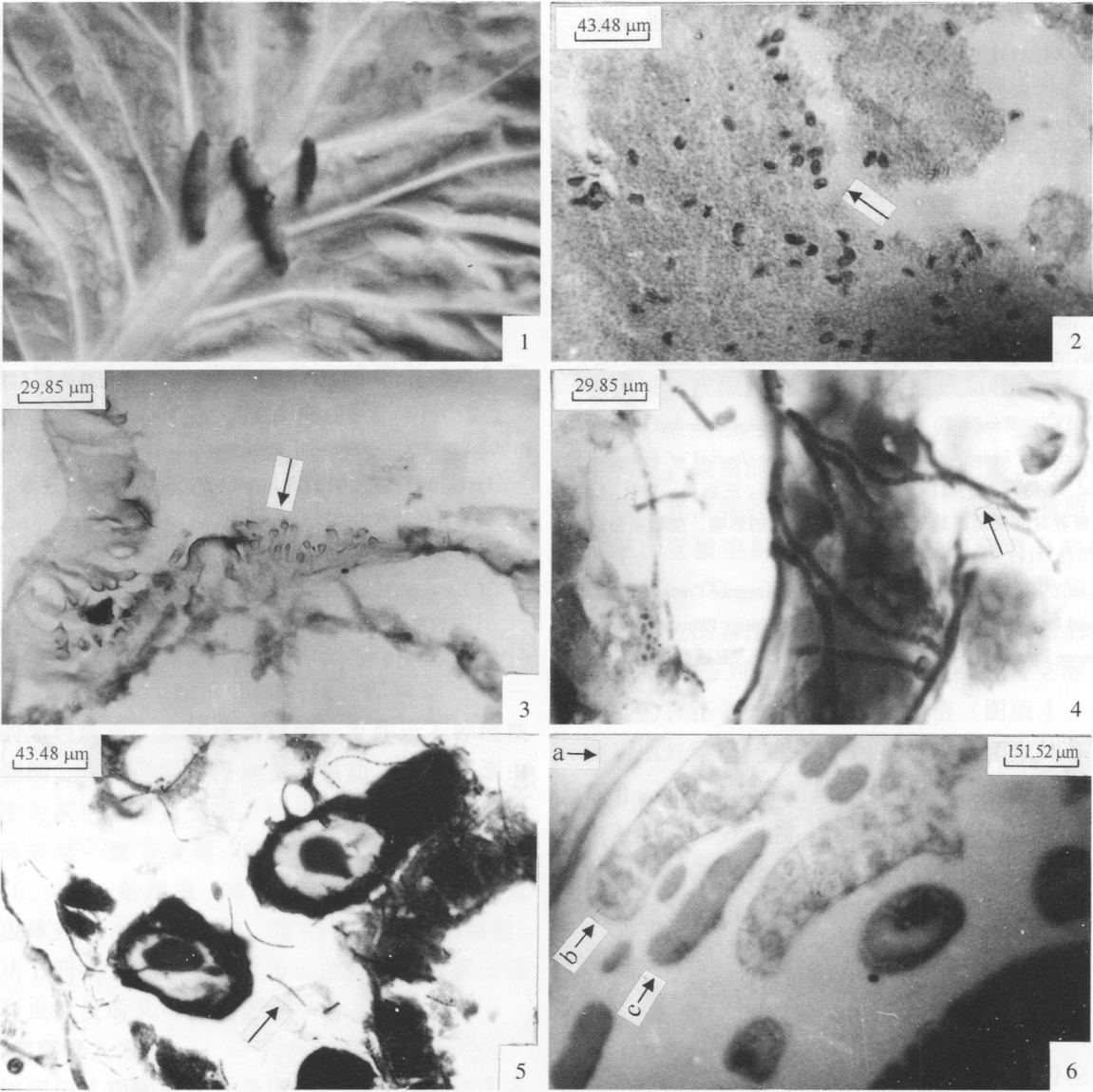
蜡蚧轮枝菌对虫体的侵染主要是体壁感染，食入虫体消化道内的分生孢子不能萌发，这可能是由于鳞翅目昆虫消化道内碱性的消化液不利于喜欢偏酸性真菌孢子的萌发（蒲蛰龙和李增智，1996）。此外，还可能与肠道内微生态条件不能满足该菌分生孢子萌发的需求有关。

本试验采用番红-固绿对染法进行染色与传统的铁钒-苏木精染色方法相比，效果较好。

参 考 文 献 (References)

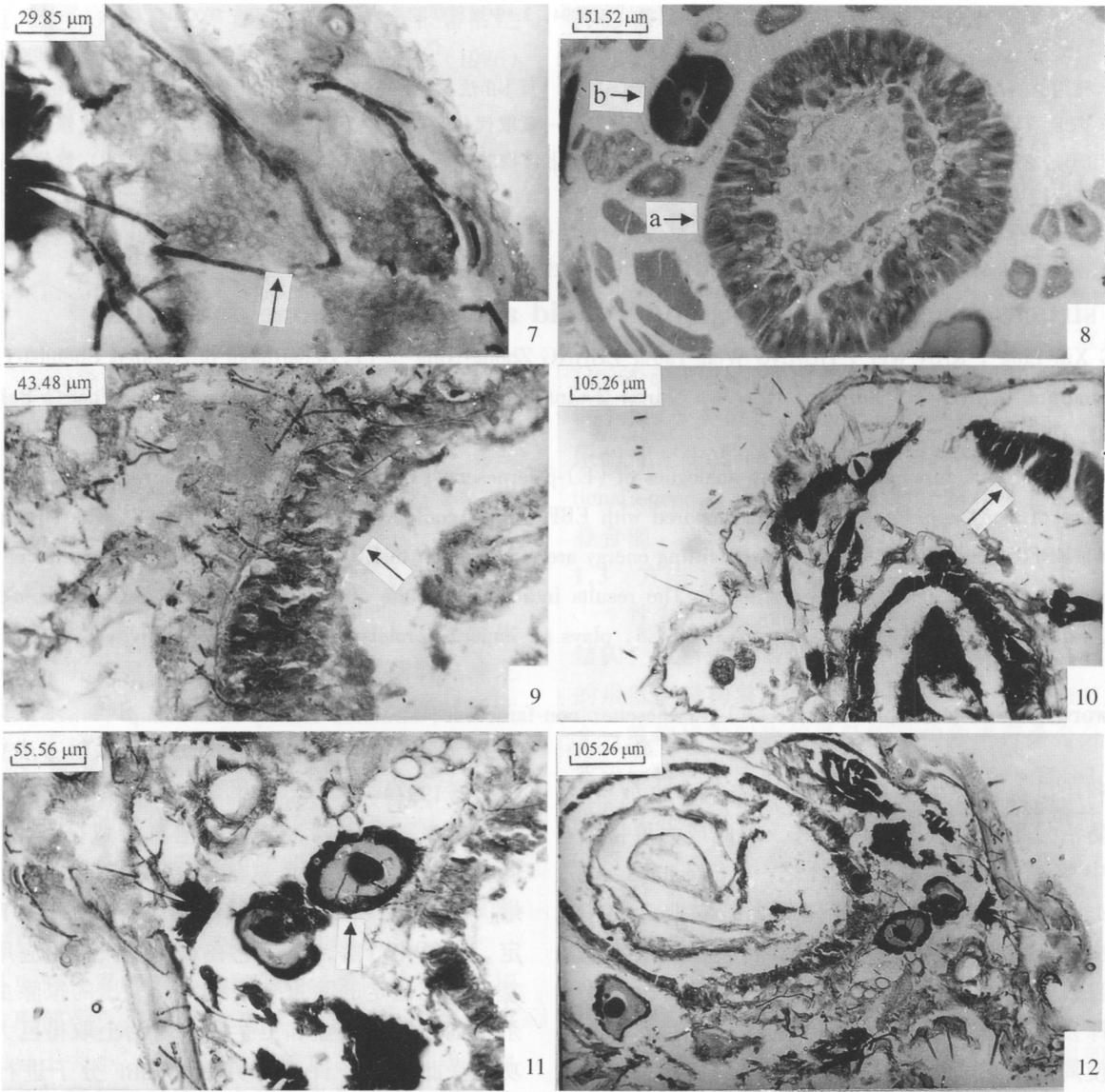
- Askary H, Carriere Y, Belanger R R, 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Science Technology*, 8 (1): 23 - 32.
- Fang Z D, 1998. Research Methods in Plant Diseases. Beijing: China Agricultural Press. 1 - 344. [方中达, 1998. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社. 1 - 344]
- Feng K C, Liu B L, Tzeng Y M, 2000. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering*, 23 (1): 25 - 29.
- Hall R A, 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticides against aphids and scales. In: Burges H D ed. Microbial Control of Pests Plant Diseases 1970 - 1980. London: Academic Press. 483 - 498.
- Hall R A, 1982. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphids, *Aphis gossypii* in glasshouse by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.*, 101: 1 - 11.
- Li G X, Yan Y H, Wang L Y, 1991. The effect of temperature and nutrition on *Verticillium lecanii* of Beijing area. *Chinese Journal of Biological Control*, 7 (3): 115 - 119. [李国霞, 严毓骅, 王丽英, 1991. 温度和营养对北京地区蜡蚧轮枝菌生长发育的影响. 生物防治通报, 7 (3): 115 - 119]
- Li G X, Yan Y H, Wang L Y, 1992. Progress in Integrate Control on Disease and Insect Pests of Important Vegetable. Beijing: China Agricultural Science Press. 119 - 124. [李国霞, 严毓骅, 王丽英, 1992. 主要蔬菜病虫害综合防治进展. 北京: 中国农业科学出版社. 119 - 124]
- Li G X, Gao X W, Liu Q C, Yan Y H, 1995. A study on ferment cultures of *Verticillium lecanii* and the efficacy of the fungus metabolites on insect pests. *Journal of Beijing Agricultural University*, (21) 4: 409 - 415. [李国霞, 高希武, 刘青春, 严毓骅, 1995. 蜡蚧轮枝菌的发酵培养及其代谢产物对害虫毒杀作用的初步研究. 北京农业大学学报, 21 (4): 409 - 415]
- Li G X, Yan Y H, Wang L Y, 1996. The biology of eleven *Verticillium lecanii* isolates cultured with monospores and the comparison and selection of their pathogenicity against *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of China Agricultural University*, (1): 83 - 88. [李国霞, 严毓华, 王丽英, 1996. 蜡蚧轮枝菌 11 个单孢菌株的生物学及其对温室白粉虱致病性的比较和筛选. 中国农业大学学报, (1): 83 - 88]
- Luo X G, 1988. An important fungus—*Verticillium lecanii*. *Guizhou Agricultural Science*, (1): 55 - 64. [罗小刚, 1988. 一种重要的昆虫病原真菌——蜡蚧轮枝菌 *V. lecanii*. 贵州农业科学, (1): 55 - 64]
- Pu Z L, Li Z Z, 1996. The Fungus of Insect. Hefei: Anhui Sciencetech Press. 93 - 111. [蒲蛰龙, 李增智, 1996. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社. 93 - 111]
- Wu J W, Chang S H, Wang D X, 1980. The observation and identification of *Entomophthora aulicae*. *Acta Microbiologica Sinica*, (20) 1: 68 - 71. [武颢文, 常绍慧, 王德祥, 1980. 灯蛾虫霉的观察和鉴定. 微生物学报, 20 (1): 68 - 71]

ZHANG Xian-Hong *et al.*: Histopathological changes of *Pieris rapae* (L.) larvae infected by *Verticillium lecanii* (Zimm.) viega



1. 感病菜青虫幼虫 Infected cabbage caterpillars; 2. 食入中肠内的分生孢子 Conidia in midgut (230 ×); 3. 昆虫体表萌发的孢子及病变体壁 Germinating conidia on insect cuticle (335 ×); 4. 体壁内的菌丝体 Hyphae in cuticle (335 ×); 5. 体腔内的菌丝体 Hyphae in hemocoel (230 ×); 6. 健康的菜青虫幼虫体壁 (a)、脂肪体 (b) 和肌肉 (c) Healthy cabbage caterpillar larvae of cuticle (a), fat body (b) and muscle (c) (66 ×)

ZHANG Xian-Hong *et al.*: Histopathological changes of *Pieris rapae* (L.) larvae infected by *Verticillium lecanii* (Zimm.) viega



7. 感病后的脂肪体 Infected fat body (335 ×); 8. 健康的菜青虫幼虫的中肠 (a) 及丝腺 (b) Midgut (a) and silk gland (b) of a healthy cabbage caterpillar (66 ×); 9. 感病后的中肠 Midgut infected (230 ×); 10. 感病的肌肉 Muscle infected (95 ×); 11. 侵入丝腺内的菌丝体及病变的丝腺 Hyphae in silk gland (180 ×); 12. 发生病变的内部组织 Tissue infected (95 ×)